

(10)



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



(11) Veröffentlichungsnummer: **0 676 468 A2**

(12)

# EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 95103785.2

(51) Int. Cl.<sup>6</sup> **C12N 15/12, C07K 14/725,  
C07K 16/28, A61K 38/17,  
A61K 39/395, C12N 5/10**

(22) Anmeldetag: 15.03.95

Der Anmelder hat nachträglich ein Sequenzprotokoll eingereicht und erklärt, dass dieses keine neuen Angaben enthält.

(52) Priorität: 16.03.94 DE 4408999

(54) Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
11.10.95 Patentblatt 95/41

(56) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU MC  
NL PT SE**

(71) Anmelder: **B. BRAUN MELSUNGEN AG**  
**Carl-Braun-Strasse 1**  
**D-34212 Melsungen (DE)**

(72) Erfinder: **Ziegler, Annette G., Dr.**  
**Hedwigstrasse 11**  
**D-80636 München (DE)**  
Erfinder: **Schendel, Dolores, Prof. Dr.**  
**Hans Sachs Strasse 12**  
**D-41065 München (DE)**  
Erfinder: **Steinle, Alexander**  
**Dachauer Strasse 163**  
**D-80992 München (DE)**  
Erfinder: **Durinovc-Bello, Ivana, Dr.**  
**Tatzelwurmweg 7**  
**D-82031 Grünwald (DE)**

(74) Vertreter: **Weiss, Wolfgang, Dr. Dipl.-Chem. et  
al**  
**Patentanwälte**  
**Weickmann & Partner,**  
**Kopernikusstrasse 9**  
**D-81679 München (DE)**

(84) **Humane T-Zellrezeptoren zur diagnostischen sowie therapeutischen Verwendung bei  
autoimmunem Diabetes mellitus.**

(87) Die Erfindung betrifft neue Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen des humanen T-Zellrezeptors und deren Verwendung für die Diagnostik und Therapie des autoimmunen Typ I Diabetes mellitus.

**EP 0 676 468 A2**

Die Erfindung betrifft neue Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen des humanen T-Zellrezeptors und deren Verwendung für die Diagnostik und Therapie des autoimmunen Typ I Diabetes mellitus.

Der Typ I Diabetes mellitus ist nach heutigen Erkenntnissen eine Autoimmunerkrankung, die durch eine gezielte Zerstörung der Insulin-produzierenden  $\beta$ -Zellen der Langerhans-Inseln im Pankreas verursacht wird. Es gibt Hinweise, daß diese Zerstörung durch autoreaktive T-Lymphozyten vermittelt wird, die mit spezifischen "Betazellen-Selbstpeptiden" (Autoantigenen) reagieren.

Die Bindung der T-Zellen an Autoantigene wird über den T-Zellrezeptor vermittelt. Das Bindungsrepertoire von T-Zellrezeptoren wird durch positive und negative Selektion über eine Reaktion mit Selbst-Peptiden bestimmt, die an Moleküle des Major Histocompatibility Complex (MHC) gebunden sind (Davies und Bjorkmann (1988), Nature 334: 395). Bei humanen Autoimmunerkrankheiten, wie etwa der Multiplen Sklerose, der rheumatoiden Arthritis und autoimmunen Schilddrüsenkrankheiten wurde ein definiertes TCR-Repertoire in Lymphozyten gefunden, welche die betroffenen Organe infiltrieren (Oksenberg et al. (1990), Nature 345: 344; Paliard et al. (1991), Science 253: 325; Davies et al. (1991), N. Engl. J. Med. 325: 238).

Beim autoimmunen Typ I Diabetes mellitus gibt es nur wenige Untersuchungen über das TCR-Repertoire in Insel-infiltrierenden Lymphozyten, da Pankreasgewebe nur sehr schwer erhältlich ist. Yamagata et al. ((1993), Autoimmunity 15: 52) beschreiben eine dominante Verwendung von TCR-V $\alpha$ 4- und V $\alpha$ 6-Gensegmenten in Pankreasbiopsien bei Typ I Diabetes-Patienten. Trucco et al. ((1993), Diabetes 42: Suppl. 1 4a) beschreiben eine prominente Expression des TCR-V $\beta$ 7-Gensegments in T-Zellen, die aus den Langerhans-Inseln eines an Typ I Diabetes verstorbenen Kindes isoliert wurden. Weitere Untersuchungen des TCR-V $\beta$ -Repertoires in peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) von Diabetes-Patienten im Frühstadium (Konttinen et al. (1991), Clin. Exp. Immunol. 83: 347; Wong et al. (1993), Autoimmunity 15: 52) oder bei Zwillingen (Malhotra et al. (1992), Immunol. 149: 1802) zeigten keine Assoziation mit einer der untersuchten V $\beta$ -Gen-Familien.

Ein Grund für das bisherige Scheitern, definierte Muster der TCR-Verwendung in peripherem Blut von frisch diagnostizierten Typ I Diabetes-Patienten zu identifizieren, kann darin bestehen, daß die T-Zellen einer Reihe von verschiedenen Autoantigenen ausgesetzt sind, die während des Krankheitsverlaufs auftreten.

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand somit darin, Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen von T-Zellrezeptoren bereitzustellen, die mit Autoantigenen aus  $\beta$ -Zellen der Langerhans-Inseln spezifisch reagieren.

Erfindungsgemäß wurde diese Aufgabe gelöst durch Isolierung von T-Zellklonen aus einem Patienten mit Typ I Diabetes, die spezifisch mit Betazell-Membranfragmenten reagieren, und Bestimmung der Nukleinsäure- und Aminosäuresequenz der T-Zellrezeptormoleküle in diesen Klonen. Insbesondere wurden CDR3-Regionen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten der T-Zellrezeptoren bestimmt, bei der es sich vermutlich genau um die Region im T-Zellrezeptor handelt, die mit dem erkannten Antigen interagiert.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit eine Nukleinsäure, die für einen Abschnitt aus der CDR3-Region einer Kette eines humanen T-Zellrezeptors codiert, umfassend:

- (a) eine der in SEQ ID NO. 1 - 6 dargestellten Nukleinsäuresequenzen,
- (b) eine Nukleinsäuresequenz, die einer der Sequenzen aus (a) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entspricht, oder
- (c) eine Nukleinsäuresequenz, die eine Homologie von mindestens 80 % zu einer Nukleinsäuresequenz aus (a) oder/und (b) aufweist.

Die in SEQ ID NO. 1 - 6 gezeigten Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen sind Bereiche aus den CDR3-Regionen der T-Zellrezeptoren aus den gefundenen T-Zellklonen. SEQ ID NO. 1 bzw. SEQ ID NO. 4 stammen aus der  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Kette des Klon K2.12. SEQ ID NO. 2 bzw. SEQ ID NO. 5 stammen aus der  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Kette des Klon K2.16. SEQ ID NO. 3 bzw. SEQ ID NO. 6 stammen aus der  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Kette des Klon K2.4.

Neben den in SEQ ID NO. 1 - 6 dargestellten Nukleinsäuresequenzen oder diesen Sequenzen im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechenden Nukleinsäuresequenzen umfaßt die vorliegende Erfindung auch solche Nukleinsäuresequenzen, die eine Homologie von mindestens 80 %, vorzugsweise von mindestens 90 % zu einer der oben genannten Sequenzen aufweisen.

Vorzugsweise enthält die erfindungsgemäße Nukleinsäure noch ein oder mehrere weitere Nukleotide und codiert für eine vollständige CDR3-Region einer Kette eines humanen T-Zellrezeptors. Besonders bevorzugt enthält sie

- (a) eine der in Fig. 1 dargestellten Nukleinsäuresequenzen, in der die CDR3-Regionen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten der gefundenen T-Zellklone K2.12, K2.16 und K2.4 vollständig gezeigt sind,
- (b) eine Nukleinsäuresequenz, die einer der Sequenzen aus (a) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entspricht, oder

(c) eine Nukleinsäuresequenz, die eine Homologie von mindestens 80 % zu einer Nukleinsäuresequenz aus (a) oder/und (b) aufweist.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleinsäure, die für eine Kette eines humanen T-Zellrezeptors oder eines funktionellen Derivats davon codiert und die dadurch gekennzeichnet ist, daß ihre CDR3-Region eine Nukleinsäure wie oben definiert enthält. Vorzugsweise enthält diese Nukleinsäure weiterhin als CDR1- und CDR2-Regionen Nukleinsäuresequenzen, welche für die in Fig. 2 gezeigten Aminosäuresequenzen codieren. Diese Nukleinsäuresequenzen können aus den in Fig. 2 gezeigten Aminosäuresequenzen und dem universellen genetischen Code auf einfache Weise ermittelt werden.

Unter dem Begriff "funktionelles Derivat einer Kette eines humanen T-Zellrezeptors" im Sinne der vorliegenden Erfindung ist ein Polypeptid zu verstehen, das zusammen mit der komplementären Kette des humanen T-Zellrezeptors (oder einem Derivat einer solchen Kette) ein T-Zellrezeptor-Derivat bilden kann, das eine äquivalente Erkennungsspezifität für einen von einem MHC-Molekül präsentierten Peptidliganden wie der nicht-derivatisierte T-Zellrezeptor besitzt. Vorzugsweise weist ein derartiges T-Zellrezeptorderivat eine Bindungskonstante von mindestens  $10^{-4}$  l/mol, vorzugsweise  $10^{-4}$  bis  $10^{-5}$  l/mol für den präsentierten Peptidliganden auf.

Die Herstellung funktioneller Derivate von Ketten eines humanen T-Zellrezeptors kann beispielsweise durch Deletion, Substitution oder/und Insertion von Abschnitten des für das jeweilige Polypeptid codierenden Gens durch rekombinante DNA-Techniken erfolgen. Die Herstellung von rekombinanten T-Zellrezeptorketten ist beispielsweise bei Blank et al. (1993), Eur. J. Immunol. 23, 3057-3065; Lin et al. (1990), Science 249: 677; Gregoire et al. (1991); Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8077; Kappes und Toneyaga (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10619 und Ward (1991), Scand. J. Immunol. 34: 215 beschrieben. Auf diese Literaturstellen wird hiermit ausdrücklich Bezug genommen.

Wenn die erfindungsgemäße Nukleinsäure für eine  $\alpha$ -Kette eines humanen T-Zellrezeptors oder eines funktionellen Derivats davon codiert, enthält sie vorzugsweise ein exprimiertes V-Gensegment aus den Genfamilien V $\alpha$ 1, V $\alpha$ 5 oder V $\alpha$ 12, insbesondere V $\alpha$ 1.3a, V $\alpha$ 5.1 oder V $\alpha$ 12.1. Weiterhin enthalten die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren vorzugsweise exprimierte JaG, JaAB11 oder JaO8-Gensegmente.

Wenn die erfindungsgemäße Nukleinsäure für eine  $\beta$ -Kette eines humanen T-Zellrezeptors oder eines funktionellen Derivats davon codiert, enthält sie vorzugsweise ein exprimiertes V-Gensegment aus den Genfamilien V $\beta$ 8, V $\beta$ 9 oder V $\beta$ 16, insbesondere V $\beta$ 8.1, V $\beta$ 9.2 oder V $\beta$ 16.1. Weiterhin ist es bevorzugt, daß die erfindungsgemäße Nukleinsäure ein exprimiertes J $\beta$ 1.5, J $\beta$ 2.4 oder J $\beta$ 2.3 Gensegment enthält.

Die  $\alpha$ -Kette des T-Zellrezeptors aus dem Klon K2.12 wurde aus V $\alpha$ 5.1 und JaG, die des Klons K2.16 aus V $\alpha$ 12.1 und JaAB11 und die des Klons K2.4 aus V $\alpha$ 1.3a und JaO8-Gensegmenten kombiniert. Die  $\beta$ -Kette des T-Zellklons K2.12 wurde aus V $\beta$ 8.1 und J $\beta$ 1.5, die des Klons 2.16 aus V $\beta$ 16.1 und J $\beta$ 2.3 und die des Klons K2.4 aus V $\beta$ 9.2 und J $\beta$ 2.4 Gensegmenten kombiniert. Angaben zu den Nuklein- bzw. Aminosäuresequenzen für V- und J-Gensegmente finden sich für V $\alpha$ 1.3 bei Obata und Kashiwagi, in Tsuji et al. (Hrsg.), HLA 1991, Bd. 1, S. 865, Oxford University Press (1992); für V $\alpha$ 5.1 und JaO8 bei Roman-Roman et al. (1991), Eur. J. Immunol. 21: 927; für V $\alpha$ 12.1 bei Sim et al. (1984), Nature 312: 771; für JaG bei Yoshikai et al. (1986), J. Exp. Med. 164: 90; für JaAB11 bei Klein et al. (1987), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 6884; für V $\beta$ 8.1 bei Yanagi et al. (1984), Nature 308: 145; für V $\beta$ 9.2 bei Ferradini et al. (1991), Eur. J. Immunol. 21: 935; für V $\beta$ 16.1 bei Kimura et al. (1986), J. Exp. Med. 164: 739 und für J $\beta$  bei Toyonaga et al. (1985), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 8624. Auf diese Literaturstellen wird ausdrücklich Bezug genommen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Vektor, der mindestens eine Kopie einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure enthält. Der Vektor kann ein prokaryontischer Vektor oder ein eukaryontischer Vektor sein. Beispiele für prokaryontische Vektoren sind Plasmide, Cosmide, Bakteriophagenvektoren (Bakteriophage lambda oder einzelsträngige filamentöse Bakteriophagen, z.B. M13). Diese Vektoren sind in Sambrook et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd Edition (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, in den Kapiteln 1 bis 4 ausführlich beschrieben. Vorzugsweise ist der prokaryontische Vektor ein Plasmid.

Andererseits kann der Vektor auch ein eukaryontischer Vektor sein, z.B. ein Hefevektor, ein Pflanzenvektor (Baculovirus) oder ein Säugervektor (SV40, Rinder-Papillomavirus, Epstein-Barr-Virus). Beispiele für eukaryontische Vektoren sind in Sambrook et al., supra, Kapitel 16 und Winnacker, Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (1985), VCH Verlagsgesellschaft, insbesondere in dem Kapitel 5, 8 und 10 beschrieben.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Zelle, die mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure oder mit einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert ist. Die Zelle kann eine prokaryontische Zelle (z.B. eine gram-negative Bakterienzelle, insbesondere E.coli) oder eine eukaryontische Zelle (z.B. eine Hefe-, Pflanzen- oder Säugerzelle) sein. Beispiele für geeignete Zellen und Verfahren zum

Einführen der erfindungsgemäßen Nukleinsäure in derartige Zellen finden sich in den obigen Literaturstellen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Polypeptid, das von einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure codiert ist. Vorzugsweise ist das Polypeptid eine Kette eines humanen T-Zellrezeptors oder ein funktionelles Derivat.

In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung ein Polypeptid, das eine Kette eines humanen T-Zellrezeptors oder ein funktionelles Derivat davon ist und als Abschnitt der CDR3-Region

(a) eine der in SEQ ID NO. 1 - 6 gezeigten Aminosäuresequenzen oder

(b) eine Aminosäuresequenz mit einer äquivalenten Erkennungsspezifität für die Peptidkomponente des T-Zellrezeptorliganden aufweist.

Vorzugsweise umfaßt das erfindungsgemäße Polypeptid eine vollständige CDR3-Region einer Kette eines humanen T-Zellrezeptors, die neben den in SEQ ID NO. 1 - 6 angegebenen Sequenzen zusätzlich weitere Aminosäuren und insbesondere eine der in Fig. 1 dargestellten vollständigen CDR3-Aminosäuresequenzen enthält. Besonders bevorzugt enthält das Polypeptid weiterhin eine der in Fig. 2 dargestellten CDR1 oder/und CDR2-Aminosäuresequenzen.

Die Erfindung betrifft neben Polypeptiden, welche die in SEQ ID NO. 1 - 6 gezeigten Aminosäuresequenzen aufweisen, auch noch solche Polypeptide, die eine Aminosäuresequenz mit einer äquivalenten Erkennungsspezifität für die Peptidkomponente des T-Zellrezeptorliganden aufweisen. Eine äquivalente Erkennungsspezifität liegt vor, wenn die Proliferation von T-Zellen, die den entsprechenden T-Zellrezeptor tragen, durch eine Betazell-Membranantigenpräparation, die z.B. aus Ratteninsulinomzellen, Ratteninselzellen, humanen Inselzellen oder NOD-Mausinselzellen erhältlich ist, stimulierbar ist.

Vorzugsweise besitzt ein derartiges Polypeptid als Abschnitt der CDR3-Region eine der in SEQ ID NO. 1 - 6 dargestellten Aminosäuresequenzen. Andererseits kann das Polypeptid als CDR3-Region auch eine aus den in SEQ ID NO. 1 - 6 dargestellten Aminosäuresequenzen durch einen oder mehrere Aminosäureaustausche abgeleitete Sequenz aufweisen. Diese Aminosäureaustausche sind vorzugsweise konservative Aminosäureaustausche. Beispiele für solche konservativen Aminosäureaustausche sind der Austausch einer hydrophoben Aminosäure gegen eine andere hydrophobe Aminosäure (z.B. Leu gegen Ile oder Ala), der Austausch einer sauren Aminosäure gegen eine andere saure Aminosäure (z.B. Glu gegen Asp), der Austausch einer basischen Aminosäure gegen eine andere basische Aminosäure (z.B. Arg gegen Lys) oder der Austausch einer polaren Aminosäure gegen eine andere polare Aminosäure (Asn gegen Gln oder Ser gegen Thr). Weitere Beispiele für konservative Aminosäureaustausche finden sich bei Dayhoff et al., in Atlas of Protein Sequence and Structure, Vol. 5, Suppl. 3 (ed. M.O. Dayhoff), p. 345, The National Biomedical Research Foundation, Washington, DC (1979).

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Polypeptid, das T-Zell-Rezeptoreigenschaften, d.h. insbesondere die Fähigkeit zur Erkennung und Bindung eines von einem MHC-Molekül präsentierten Peptidliganden mit einer Bindungskonstante von vorzugsweise mindestens  $10^{-4}$  l/mol aufweist und aus zwei der vorstehend genannten erfindungsgemäßen Polypeptide als Untereinheiten aufgebaut ist, wobei eine Polypeptiduntereinheit eine  $\alpha$ -Kette eines humanen T-Zellrezeptors oder ein funktionelles Derivat davon ist und die andere Polypeptiduntereinheit eine  $\beta$ -Kette eines humanen T-Zellrezeptors oder ein funktionelles Derivat davon ist.

Die Herstellung eines solchen Polypeptids mit T-Zell-Rezeptoreigenschaften kann durch gemeinsame Expression der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kettenuntereinheiten in einer geeigneten Wirtszelle, z.B. einer Bakterienzelle oder einer Säugerzelle und anschließende Isolierung des Produkts aus der Zelle oder durch getrennte Expression der einzelnen Untereinheiten und Rekombination in vitro erfolgen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Antikörper gegen ein erfindungsgemäßes Polypeptid, der wegen eine für die Erkennung des Peptidliganden verantwortliche Region des Polypeptids gerichtet ist. Vorzugsweise ist dieser Antikörper ein monoklonaler Antikörper oder ein Fragment eines monoklonalen Antikörpers (z.B. ein Fab-, F(ab)<sub>2</sub>-, Fab' oder F(ab')<sub>2</sub>-Fragment). Vorzugsweise ist der Antikörper gegen eine CDR3-Region des Polypeptids oder einen Bereich davon gerichtet. Derartige Antikörper können nach an sich bekannten Methoden durch Immunisierung eines Versuchstiers mit einem Peptid oder Polypeptid, welches eine erfindungsgemäße CDR3-Region oder einen Abschnitt davon enthält, und Gewinnung der resultierenden Antikörper aus dem Versuchstier erhalten werden. Monoklonale Antikörper können durch Fusion einer Antikörper-produzierenden B-Zelle des Versuchstiers mit einer Leukämiezelle nach der Methode von Köhler und Milstein oder einer Weiterentwicklung davon erhalten werden. Spezifische Beispiele für die Herstellung solcher Antikörper finden sich bei Choi et al. (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8357 und Zumla et al. (1992), Hum. Immunol. 35: 141.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine T-Zelle, die einen erfindungsgemäßen T-Zellrezeptor enthält. Derartige T-Zellen können aus Patienten mit Typ 1 Diabetes isoliert werden. Hierzu

können beispielsweise die peripheren mononukleären Blutzellen eines Patienten durch Stimulation mit Membranantigenen aus Ratteninsulinomzellen und anschließender Restimulation durch eine bestrahlte autologe Lymphoblastoidzelllinie erzeugt werden.

- 5 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine pharmazeutische Zusammensetzung, die als aktive Komponente eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, ein erfindungsgemäßes Polypeptid, eine erfindungsgemäßen Antikörper oder eine erfindungsgemäße T-Zelle als Wirkstoff enthält. Diese pharmazeutische Zusammensetzung kann vorzugsweise zur Herstellung eines diagnostischen oder/und therapeutischen Mittels für Typ I Diabetes verwendet werden.

- Der erfindungsgemäße Antikörper, der den Komplex von Autoantigen und T-Zellrezeptor erkennt, kann 10 als spezifisches immunsuppressives Mittel eingesetzt werden, z.B. als Impfstoff gegen autoreaktive T-Zellpopulationen in einem Typ I Diabetes-Patienten.

- Weiterhin könnte das erfindungsgemäße Polypeptid oder die erfindungsgemäße T-Zelle zur Herstellung eines Immunogens verwendet werden, wodurch die Erzeugung von spezifischen Antikörpern gegen die entsprechende variable Region des T-Zellrezeptors im Empfänger bewirkt werden kann. Bei Verwendung 15 von ganzen T-Zellen als Immunogen sollten diese attenuiert sein, d.h. nicht mehr zur Proliferation in der Lage sein. Diese Attenuierung erfolgt vorzugsweise durch Bestrahlung oder/und Hitzebehandlung. Beispiele für eine T-Zellvakzinierung sind etwa bei Cohen und Weiner (1988), Immunology Today 9: 332, Lieder et al. (1988), Science 239: 181; Lohse et al. (1989), Science 244: 820 und Mor et al. (1990), J. Clin. Invest. 85: 1594 beschrieben. Auf diese Techniken wird ausdrücklich Bezug genommen.

- 20 Schließlich betrifft die Erfindung auch einen Komplex, der einen erfindungsgemäßen T-Zellrezeptor und ein Peptid-präsentierendes HLA-Molekül der Klasse DQw1 umfaßt.

Weiterhin wird die vorliegende Erfindung durch die folgenden Abbildungen und Sequenzprotokolle erläutert.

Es zeigen:

- 25 Fig. 1 die Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen der T-Zellrezeptoren aus den humanen T-Zellklonen K2.12, K2.16 und K2.4 in den Verbindungsregionen zwischen V- und J-Gensegmenten (N- bzw. NDN-Regionen),  
Fig. 2a die Aminosäuresequenzen der T-Zellrezeptoren aus den humanen T-Zellklonen K2.12, K2.16 und K2.4 in den CDR1-, CDR2- und CDR3-Regionen,  
30 Fig. 2b einen Vergleich der CDR3-Regionen der  $\alpha$ -Kette des humanen T-Zellklons K2.4 und der  $\beta$ -Kette des humanen T-Zellklons K2.12 mit murinen T-Zellrezeptoren,  
Fig. 3 die Variation der Expression von TCR-V $\alpha$ - und V $\beta$ -Genfamilien bei Stimulierung der Proliferation von T-Zellen aus einem Diabetes-Patienten mit Betazell-Membranantigenen,  
35 SEQ ID NO. 1: die Nukleinsäure- und Aminosäuresequenz eines Abschnitts aus der CDR3-Region der  $\alpha$ -Kette des TCR aus dem Klon K2.12,  
SEQ ID NO. 2: die Nukleinsäure- und Aminosäuresequenz eines Abschnitts aus der CDR3-Region der  $\alpha$ -Kette des TCR aus dem Klon K2.16,  
SEQ ID NO. 3: die Nukleinsäure- und Aminosäuresequenz eines Abschnitts aus der CDR3-Region 40 der  $\beta$ -Kette des TCR aus dem Klon K2.4,  
SEQ ID NO. 4: die Nukleinsäure- und Aminosäuresequenz eines Abschnitts aus der CDR3-Region der  $\beta$ -Kette des TCR aus dem Klon K2.12,  
SEQ ID NO. 5: die Nukleinsäure- und Aminosäuresequenz eines Abschnitts aus der CDR3-Region der  $\beta$ -Kette des TCR aus dem Klon K2.16 und  
45 SEQ ID NO. 6: die Nukleinsäure- und Aminosäuresequenz eines Abschnitts aus der CDR3-Region der  $\beta$ -Kette des TCR aus dem Klon K2.4.

#### Beispiel 1

- 50 Herstellung von Membranantigenen

- Membranantigene aus Ratteninsulinomzellen 5AHT2 (Beta-Membranantigen, BMA), Ratteninselnzellen, Rattenmilz aus adulten Wistar-Ratten, NOD-Mausinselnzellen, humanen Inselzellen, humanen CAK1-Zellen (ATCC HTB46) und SW579-Zellen (ATCC HTB107) wurden nach dem Verfahren von van Vliet ((1989), Eur. J. Immunol. 19: 213) hergestellt. Die Zelllinien oder Gewebekomponenten wurden in Saccharosepuffer (0,32 M Saccharose, pH 7,4) bei 4 °C resuspendiert, aliquotiert und in einem Glasgefäß unter Verwendung eines Teflonstabes homogenisiert. Das Aufbrechen der Zellen wurde mikroskopisch überwacht. Die Suspension von Zellfragmenten wurde für 5 Minuten bei 900 g zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde für 30

Minuten bei 13000 g zur Pelle-tierung der Membranen erneut zentrifugiert. Diese Membranen wurden zweimal in Tris-HCl (50 mM, pH 7,4) mit wiederholter Zentrifugation für 20 Minuten bei 27000 g gewaschen. Das Pellet wurde in Tris-HCl resuspendiert und Aliquots wurden bei -70 °C aufbewahrt. Der Proteingehalt wurde nach dem Verfahren von Lowry et al. ((1951), J. Biol. Chem. 193: 265) unter Verwendung von Rinderserumalbumin als Standard ermittelt.

## Beispiel 2

### Erzeugung von Antigen-spezifischen T-Zellen

Aus peripheren mononukleären Blutzellen eines Typ I Diabetes-Patienten, die in Kulturmedium unter Zusatz von 10 % Hitze-inaktiviertem Humanserum, 25 % T-Zellwachstumsfaktor (Lotze et al. (1980), J. Immunol. 124: 2927) und 40 µg/ml der in Beispiel 1 hergestellten BMA-Präparation stimuliert wurden, wurde eine T-Zelllinie erhalten. Nach 24 h wurde neues Kulturmedium mit 40 U/ml rekombinanten IL-2 zugesetzt. Die T-Zelllinie wurde wöchentlich durch Zugabe von bestrahlten (60 Gy) autologen Lymphoblastoidzellen (LCL) als Antigen-präsentierenden Zellen und 20 µg/ml BMA restimuliert und für 40 Tage in Kultur gehalten. Die autologen Lymphoblastoidzellen stammten von einer Zelllinie, die durch Transformation der peripheren mononukleären Blutzellen des Patienten mit 50 % eines Epstein-Barr-Virus enthaltenden Überstands hergestellt wurde, der aus einer 12 Tage-Kultur einer Marmoset-Zelllinie (ATCC CRL 1612) und 1 % PHA (Difco Co., Detroit) erhalten wurde.

Anschließend wurden die Zellen gesammelt und in Kulturmedium (RPMI 1640, 2 mM L-Glutamin, 2 mM Na-Pyruvat, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10 % fötales Kälberserum (FCS, BRL Gibco, Freiburg)) unter Zusatz von 50 % FCS und 10 % Dimethylsulfoxid eingefroren und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Aus dieser T-Zelllinie wurden T-Zellklone durch Stimulation mit BMA für 8 Tage nach der von van Vliet et al., supra, beschriebenen Methode hergestellt. Die Zellen wurden mit einer Konzentration von 0,5 Zellen pro Loch in Kulturmedium mit 10 % Humanserum in 96 Loch-Flachbodenmikrotiterplatten ausplattiert, die autologe lymphoblastoide Zellen ( $4 \times 10^4$  Zellen/Loch, mit 60 Gy bestrahlt), einen Pool peripherer mononuklearer Blutzellen von 6 Donoren ( $8 \times 10^4$  Zellen/Loch, mit 40 Gy bestrahlt) und 40 µg/ml BMA in einem Gesamtvolumen von 200 µl/Loch enthielten. Nach 2 Tagen wurden 50 µl frisches Kulturmedium mit 10 % Humanserum und 40 U/ml rekombinanten IL-2 pro Loch zugesetzt. Die wachsenden Klone wurden auf 24 Loch-Kulturplatten (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) überführt und wöchentlich durch Zugabe von 10 µg/ml BMA und bestrahlten autologen Lymphoblastoidzellen restimuliert.

## Beispiel 3

### Antigen-spezifische Proliferation der T-Zelllinie und der T-Zellklone

Nach der Methode von Wank et al. ((1979), Scan. J. Immunol. 9 (6): 499) wurden Proliferationsassays in 96-Loch-Flachbodenplatten durch Inkubation von  $10^4$  T-Zellen mit  $2,5 \times 10^5$  bestrahlten autologen peripheren mononukleären Blutzellen und 10 µg/ml Membranpräparationen verschiedener Quellen für 3 Tage durchgeführt. Als Kontrolle wurden Zellen mit autologen peripheren mononukleären Blutzellen oder Lymphoblastoidzellen alleine inkubiert. 18 Stunden vor der Beendigung des Tests wurde 1 µCi mit Tritium markiertes Methylthymidin ( $^3\text{H}$ -TdR; DuPont de Nemours, Deutschland) zugegeben. Die Proben wurden gesammelt und die Aufnahme von  $^3\text{H}$ -TdR wurde durch Flüssigkeitsszintillationszählung gemessen.

Drei Klone, K2.4, K2.12 und K2.16, die die stärksten Proliferationsreaktionen mit BMA im Vergleich zur Kontrolle zeigten, wurden mit verschiedenen Membranpräparationen getestet. Tabelle 1 faßt die Ergebnisse dieses Experiments zusammen. Die T-Zelllinie und die Zellklone zeigten eine starke Proliferation mit Membranantigenpräparationen von Ratteninsulinomzellen (BMA), Ratteninselnzellen, humanen Inselzellen und NOD-Mausinselnzellen, dagegen praktisch keine Proliferation mit Membranantigenpräparationen von Rattenmilz, humanen SW579 Zellen und CAK1-Zellen oder autologen peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) und Lymphoblastoidzellen.

Tabelle 1: Proliferation einer BMA-spezifischen T-Zelllinie und von T-Zellklonen aus einem Typ I Diabetes-Patienten

Antigene	T-Zelllinie	K2.12	K2.16	K2.4
Ratteninsulinom-Membranen (BMA)	81955 ± 7534	85726 ± 3745	86652 ± 3664	87270 ± 2115
Ratteninselzellmembranen	71346 ± 366	85490 ± 3392	23586 ± 5612	83820 ± 1637
NOD Mausinselzellmembranen	43942 ± 6741	91804 ± 4336	82448 ± 4103	86367 ± 2946
Humane Inselzellmembranen	92260 ± 3502	94533 ± 3409	97803 ± 3634	58386 ± 2069
Rattenmilzmembranen	3968 ± 778	3074 ± 885	4387 ± 846	4497 ± 1429
Humane SW579-Membranen	4910 ± 526	6175 ± 469	6470 ± 487	8642 ± 1771
Humane CAKI-Membranen	6717 ± 294	4953 ± 246	6430 ± 114	7129 ± 1043
Autologe PBMC	1619 ± 340	863 ± 168	1336 ± 263	1371 ± 336
Autologe Lymphoplastoidzellen	7250 ± 10	6189 ± 419	7988 ± 1745	7845 ± 777
-	2150 ± 212	1266 ± 680	2343 ± 216	1158 ± 868

- Alle Antigene wurden mit einer Konzentration von 10 µg/ml verwendet.  
 55 Die Proliferationsreaktionen sind als mittlere cpm ± SD von Dreifachkulturen ausgedrückt.  
 Die mittlere Proliferationsreaktion der T-Zelllinie und der Klone, die mit Antigenen allein stimuliert waren, betrug 3250 ± 885.

Versuche zur Erzeugung von BMA-spezifischen T-Zelllinien von vier gesunden Donoren waren nicht erfolgreich.

#### Beispiel 4

##### T-Zellrezeptor-Repertoireanalyse

Gesamt-RNA aus der T-Zelllinie wurde unter Verwendung von RNAsol<sup>®</sup> (CINNA/BIOTECH, Houston, TX) angereichert. RNA wurde durch AMV-Reverse Transkriptase (Boehringer Mannheim GmbH, Deutschland) unter Verwendung von externen Primern, die spezifisch für die konstanten Regionen des TCR $\alpha$ - oder  $\beta$ -Locus (Ca1 und C $\beta$ 1) sind (Broeren et al. (1991), Eur. J. Immunol. 21: 569), in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde dann unter Verwendung einer Palette von Oligonukleotiden, die aus 18 TCR Va (Davies et al. (1991), N. Engl. J. Med. 325: 238) und 20 V $\beta$ -Familien (Choi et al. (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8941; Obata und Kashiwagi (1993), In: HLA 1991, K. Tsuji, M. Aizawa und T. Sasazuki, Hrsg., Oxford Science Publications, Vol 1: 865-916) stammten, in Kombination mit aus der konstanten Region stammenden Primern Ca2 und C $\beta$ 2 (Broeren et al. (1991), supra) amplifiziert. Die Bedingungen für die PCR waren wie folgt: Nach einem anfänglichen Denaturierungsschritt bei 94 °C für 5 Minuten wurden 30 Zyklen mit drei Schritten bei 94 °C, 56 °C und 72 °C für jeweils 30 Sekunden durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden auf 4 % Agarosegelen aufgetrennt und analysiert. Der Prozentanteil von jeder TCR Va- oder - $\beta$ -Genfamilie wurde durch Division der Bandenintensität im Gel durch die Summe der Bandenintensitäten für alle Va- oder V $\beta$ -Genfamilien ermittelt.

Das TCR Va- und V $\beta$ -Repertoire der BMA-reaktiven Zelllinie wurde nach 8 und 40 Tagen Restimulation mit BMA bestimmt und mit dem von unstimulierten PBMC verglichen. Die Prozentanteile bestimmter TCR Va-Gene in Bezug auf die Gesamtzahl von Va-Gentranskripten variierte zwischen PBMC und der BMA-stimulierten T-Zelllinie zu beiden Zeitpunkten.

In Figur 3 ist das TCR-Repertoire von unstimulierten PBMC (gepunktete Balken) mit einer 8-tägigen Restimulation (schraffierte Balken) und einer 40-tägigen Restimulation (schwarze Balken) der BMA-spezifischen T-Zelllinie verglichen. Nach 8-tägiger Stimulation waren die Anteile an Va1, 8, 11 und 12 Genen erhöht, während nach 40-tägiger Stimulation die Expression von Va1 und insbesondere Va12 stark zunahm.

In Figur 3 ist der Einfluß der BMA-Stimulation auf das V $\beta$ -Repertoire gezeigt. Es ist zu erkennen, daß sich die Anteile der V $\beta$ 5.2, 12, 16 und 18 Gensegmente mit der Zeitdauer der BMA-Stimulierung erhöht.

#### Beispiel 5

##### Hemmung der Proliferation durch monoklonale Anti-HLA-Antikörper

Die folgenden monoklonalen Antikörper wurden in den Proliferations-Inhibitionsuntersuchungen verwendet: W6/32 gegen Klasse I-Moleküle (Barnstable et al. (1978), Cell 14:9); L243 gegen HLA-DR (Lampson und Levy (1980), J. Immunol 125: 293); 2aB8 gegen HLA-DR4, 16.23 gegen HLA-DR3 und DRw6 (Johnson et al. (1982), J. Exp. Med. 156: 104); Tü22 gegen HLA-DR und DQ (Ziegler et al. (1986), Immunobiology 171: 77); G2b.2 gegen HLA-DQw1 (Parham et al. (1983), Hum. Immunol 8: 141); LY6 gegen HLA-DQw2 und 7bF4 gegen HLA-DQw3. Die monoklonalen Antikörper 16.23 und G2b.2 wurden den Kulturen als Ascites-Flüssigkeiten mit einer 1/100 Endverdünnung zugesetzt und die restlichen Antikörper wurden als Hybridom-Überstände mit einer 1/3 Endverdünnung verwendet.

Die Klone K2.4, K2.12 und K2.16 wurden in Proliferationshemmungsuntersuchungen auf HLA-restringierte Erkennung einer Reaktion gegen BMA unter Verwendung der oben genannten HLA-spezifischen monoklonalen Antikörper getestet.

Das Ergebnis dieses Tests ist in Tabelle 2 dargestellt. Es ist zu erkennen, daß die Proliferationsreaktionen der Klone stark durch den mit HLA-DQ-Molekülen reagierenden monoklonalen Antikörper Tü22 sowie durch den für HLA-DQw1 spezifischen monoklonalen Antikörper G2b.2 gehemmt wurden. Diese Ergebnisse zeigten, daß die Proliferationsreaktionen aller drei Klone durch DQw1 restringiert wurden.

Somit präsentiert ein HLA-Molekül des Typs DQw1 das Peptid für den T-Zellrezeptor der untersuchten T-Zellklone. Die beiden Allele, die für das DQw1-Molekül kodieren, sind DQA1\*0103 und DQB1\*0603. Die HLA-DQw1-Nukleotidsequenzen sind bei Marsh und Bodmer (1992), Hum. Immunol. 35: 1 beschrieben. Auf diese Literaturstelle wird ausdrücklich Bezug genommen.



Tabelle 2: Inhibierung der BMA-spezifischen Proliferation durch monoklonale Antikörper

Monoklonale Antikörper	Spezifität	K2.12	K2.16	K2.4
keiner*				
W6/32	Klasse I	93406 ± 2502	51003 ± 246	54631 ± 5261
L243	HLA-DR	37520 ± 1077	38947 ± 1253	42091 ± 5096
2ab8	HLA-DR4	48685 ± 223	35278 ± 1489	37252 ± 2076
16.23	HLA-DR3+DRw6	44880 ± 160	31112 ± 893	32840 ± 2403
		32790 ± 298	33230 ± 447	27850 ± 852
TU22	HLA-DQ	7843 ± 808	4149 ± 102	5599 ± 644
G2b.2	HLA-DQw1	5652 ± 588	1533 ± 107	3702 ± 339
LY6	HLA-DQw2	40563 ± 431	44485 ± 4620	36422 ± 2103
7bF4	HLA-DQw3	27449 ± 965	20503 ± 201	23662 ± 2049

\* Spezifische Proliferation durch Stimulation mit Insulinomembranen (10 µg/ml) ohne Zugabe von monoklonalen Antikörpern.  
Die Proliferationsreaktionen sind als mittlere cpm ± SD von Dreifachkulturen ausgedrückt.

## Beispiel 6

## T-Zellrezeptorsequenzierung

Die Präparation von cDNA aus den T-Zellklonen und die PCR wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Die TCR  $\alpha$ - und  $\beta$ -Amplifikationsprodukte wurden mit QUIAEX (Diagen, Düsseldorf, Deutschland) aus einem Agarosegel isoliert und nach der von Casanova et al. ((1990), Nucleic Acids Res. 18: 4028) beschriebenen Methode unter Verwendung der internen Sequenzierungsprimer T-Ca (Davies et al. (1991), supra) und 3'-C $\beta$  (Choi et al. (1989), supra) und des Enzyms Sequenase 2.0 (USB, Cleveland, Ohio) sequenziert. PCR-Produkte wurden nur mit den Primern Va1 und V $\beta$ 9 für den Klon K2.4, den Primern Va5 und V $\beta$ 8 für den Klon K2.12 und den Primern Va12 und V $\beta$ 16 für den Klon K2.16 erhalten.

Es wurden die Verbindungsregionen der TCR  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten der Klone K2.4, K2.12 und K2.16 einschließlich der J-Gensegmente und der 3'-Region der V-Gensegmente sequenziert. Jeder Klon exprimierte einen unterschiedlichen T-Zellrezeptor (Figur 2). Die TCR  $\alpha$ -Kette des Klons K2.12 war aus Va5.1 und JaG, diejenige von Klon K2.16 aus Va12.1 und JaAB11 und diejenige von Klon K2.4 aus Va1.3A und Ja08-Gensegmenten zusammengesetzt. Die TCR  $\beta$ -Kette des Klons K2.12 enthielt V $\beta$ 8.1 und J $\beta$ 1.5. Diejenige des Klons K2.16 enthielt V $\beta$ 16.1 und J $\beta$ 2.3 und diejenige des Klons K2.4 enthielt V $\beta$ 9.2 und J $\beta$ 2.4.

In Fig. 1 ist die Nukleinsäuresequenz und die abgeleitete Aminosäuresequenz der TCR  $\alpha$ - und  $\beta$ -Verbindungsregionen zwischen V- und J-Gensegmenten der untersuchten Klone gezeigt. Die Bezeichnungen der exprimierten V- und J-Gensegmente wurden gemäß der Nomenklatur des XI International Histocompatibility Workshop (Obata und Kashiwagi (1993), supra) zugeordnet. Grenzen der V- und J-Gensegmente sind angegeben. Die Aminosäuren sind unter Verwendung des Einbuchstabencodes angegeben.

In Fig. 2a ist ein Aminosäuresequenzvergleich der TCR  $\alpha$ - und  $\beta$ -CDR1-, CDR2- und CDR3-Sequenzen der Klone K2.12, K2.16 und K2.4 gezeigt. Weiterhin ist in Fig. 2b ein Aminosäuresequenzvergleich der CDR3 $\beta$ -Sequenzen des Klons K2.12 und des Maus-T-Zellklons 4-1-E.2 (Nakano et al. (1991), J. Exp. Med. 173: 1091) und ein Aminosäuresequenzvergleich der CDR3 $\alpha$ -Sequenzen des Klons K2.4 und des Maus-T-Zellklons 7-10-D.3 (Nakano et al., supra) dargestellt. Beide Maus-T-Zellklone wurden aus NOD-Mäusen isoliert und induzierten nach Übertragung in gesunde, sublethal bestrahlte I-E + NOD Mäuse Insulinitis.

SEQUENZPROTOKOLL

5 SEQ ID NO. 1:  
LÄNGE: 15 Nukleotide  
5 Aminosäuren

10 CTA GAG AAC ACA GGC  
L E N T G

15 SEQ ID NO. 2:  
LÄNGE: 36 Nukleotide  
20 12 Aminosäuren

25 CTG AGT GAG GCC CCG AAT TAT GGT GGT GCT ACA AAC  
L S E A P N Y G G A T N

30 SEQ ID NO. 3:  
LÄNGE: 30 Nukleotide  
10 Aminosäuren

35 GTG ACC ACT CAG TTT TCT GGT GGC TAC AAT  
V T T Q F S G G Y N

40 SEQ ID NO. 4:  
LÄNGE: 27 Nukleotide  
45 9 Aminosäuren

50 AGT AGT GAC AGG TTA GGC AAT CAG CCC  
S S D R L G N Q P

55

SEQ ID NO. 5:

LÄNGE: 33 Nukleotide

11 Aminosäuren

AGC CAA GAT CGA CTG AGG GGT GTC GCA GAT ACG

S Q D R L R G V A D T

SEQ ID NO. 6:

LÄNGE: 18 Nukleotide

6 Aminosäuren

AGC CAA GAG GCC GAC ATT

S Q E A D I

## Patentansprüche

1. Nukleinsäure, die für einen Abschnitt aus der CDR3-Region einer Kette eines humanen T-Zellrezeptors codiert, umfassend:

- (a) eine der in SEQ ID NO. 1 - 6 dargestellten Nukleinsäuresequenzen,
- (b) eine Nukleinsäuresequenz, die einer der Sequenzen aus (a) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entspricht, oder
- (c) eine Nukleinsäuresequenz, die eine Homologie von mindestens 80 % zu einer Nukleinsäuresequenz aus (a) oder/und (b) aufweist.

2. Nukleinsäure nach Anspruch 1,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß sie für eine vollständige CDR 3-Region codiert.

3. Nukleinsäure, die für eine Kette eines humanen T-Zellrezeptors oder eines funktionellen Derivats davon codiert,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß ihre CDR 3-Region eine Nukleinsäure nach Anspruch 1 oder 2 enthält.

4. Nukleinsäure nach Anspruch 3,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß sie für eine  $\alpha$ -Kette eines humanen T-Zellrezeptors oder eines funktionellen Derivats davon codiert und ein exprimiertes V-Gensegment aus den Genfamilien V $\alpha$ 1, V $\alpha$ 5 oder V $\alpha$ 12 enthält.

5. Nukleinsäure nach Anspruch 4,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß sie ein exprimiertes V $\alpha$ 1.3a-, V $\alpha$ 5.1- oder V $\alpha$ 12.1-Gensegment enthält.

6. Nukleinsäure nach Anspruch 5,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß sie ein exprimiertes J $\alpha$ G, J $\alpha$ AB11 oder J $\alpha$ 08-Gensegment enthält.

7. Nukleinsäure nach Anspruch 3,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß sie für eine  $\beta$ -Kette eines humanen T-Zellrezeptors oder eines funktionellen Derivats davon codiert  
und ein exprimiertes V-Gensegment aus den Genfamilien V $\beta$ 8, V $\beta$ 9 oder V $\beta$ 16 enthält.
8. Nukleinsäure nach Anspruch 7,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß sie ein exprimiertes V $\beta$ 8.1-, V $\beta$ 9.2- oder V $\beta$ 16.1-Gensegment enthält.
9. Nukleinsäure nach Anspruch 7 oder 8,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß sie ein exprimiertes J $\beta$ 1.5-, J $\beta$ 2.4- oder J $\beta$ 2.3-Gensegment enthält.
10. Vektor,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß er mindestens eine Kopie einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 9 enthält.
11. Zelle,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß sie mit einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 9 oder einem Vektor nach Anspruch 10  
transformiert ist.
12. Polypeptid,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß es von einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 9 codiert ist.
13. Polypeptid nach Anspruch 12,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß es eine Kette eines humanen T-Zellrezeptors oder ein funktionelles Derivat davon ist.
14. Polypeptid, das eine Kette eines humanen T-Zellrezeptors oder ein funktionelles Derivat davon ist und  
als Abschnitt der CDR3-Region
  - (a) eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80 % zu den in SEQ ID NO. 1 - 6  
dargestellten Aminosäuresequenzen, oder
  - (b) eine Aminosäuresequenz mit einer äquivalenten Erkennungsspezifität für die Peptidkomponente  
des T-Zellrezeptorliganden aufweist.
15. Polypeptid nach Anspruch 13 oder 14,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß es als Abschnitt der CDR3-Region eine der in SEQ ID NO. 1 - 6 dargestellten Aminosäuresequenzen  
aufweist.
16. Polypeptid nach Anspruch 13 oder 14,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß es als Abschnitt der CDR3-Region eine aus den in SEQ ID NO. 1 - 6 dargestellten Aminosäuresequenzen  
durch einen oder mehrere Aminosäureaustausche abgeleitete Sequenz aufweist.
17. Polypeptid nach Anspruch 16,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß es als Abschnitt der CDR3-Region eine aus den in SEQ ID NO. 1 - 6 gezeigten Aminosäuresequenzen  
durch einen oder mehrere konservative Aminosäureaustausche abgeleitete Aminosäuresequenzen aufweist.
18. Polypeptid,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß es T-Zellrezeptor-Eigenschaften aufweist und aus zwei Polypeptiden nach einem der Ansprüche 12  
bis 17 als Unterheiten aufgebaut ist, wobei eine Polypeptiduntereinheit eine  $\alpha$ -Kette eines humanen  
T-Zellrezeptors oder ein funktionelles Derivat davon ist und die andere Polypeptiduntereinheit eine  $\beta$ -

Kette eines humanen T-Zellrezeptors oder ein funktionelles Derivat davon ist.

19. Antikörper gegen ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 12 bis 18, der gegen eine für die Erkennung des Peptidliganden verantwortliche Region gerichtet ist.
20. Antikörper nach Anspruch 19,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß er gegen eine CDR3-Region gerichtet ist.
21. T-Zelle,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß sie einen T-Zellrezeptor nach Anspruch 18 enthält.
22. Pharmazeutische Zusammensetzung, die als aktive Komponente eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 9, ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 12 bis 18, einen Antikörper nach Anspruch 19 oder 20 oder eine T-Zelle nach Anspruch 21 enthält.
23. Verwendung einer pharmazeutischen Zusammensetzung nach Anspruch 21 zur Herstellung eines diagnostischen oder/und therapeutischen Mittels für Typ I-Diabetes.
24. Verwendung eines Antikörpers nach Anspruch 19 oder 20 zur Herstellung eines Impfstoffes gegen autoreaktive T-Zellpopulationen.
25. Verwendung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 12 bis 18 oder einer T-Zelle nach Anspruch 21 zur Herstellung eines Immunogens.
26. Verwendung nach Anspruch 25,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß die T-Zelle attenuiert wird.
27. Verwendung nach Anspruch 26,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß die Attenuierung der T-Zelle durch Bestrahlung oder/und Hitzebehandlung erfolgt.
28. Komplex, umfassend ein Polypeptid nach Anspruch 18 und ein Peptid-präsentierendes HLA-Molekül der Klasse DQw1.

Figure 1

Clon.	V $\alpha$	N	J $\alpha$
K2.12	C A L TGT GCT CTA G Va5.1 (IGRa10)	E AG	N T G K L I F AAC ACA GGC AAA CTA ATC TTT JaG
K2.16	C A L S E TGT GCT CTG AGT GAG GC Va12.1 (PGA5)	A P N Y C CCG AAT TA	G G A T N K L I F T GGT GGT GCT ACA AAC AAG CTC ATC TTT JaAB11
K2.4	C A V TGT GCT GTG A Va1.3a (11wT7)	T T Q F S CC ACT CAG TTT T	G G Y N K L I F CT GGT GGC TAC AAT AAG CTG ATT TTT Ja08

Clon.	V $\beta$	NDN	J $\beta$
K2.12	C A S S TGT GCC AGC AGT V $\beta$ 8.1 (YT35)	S D R L G AGT GAC AGG TTA G	N Q P Q H F GC AAT CAG CCC CAG CAT TTT J $\beta$ 1.5
K2.16	C A S S Q TGT GCC AGC AGC CAA GA V $\beta$ 16.1 (HBVP42)	D R L R G V A T CGA CTG AGG GGT GTC G	D T Q Y F CA GAT AGC CAG TAT TTT J $\beta$ 2.3
K2.4	C A S S Q TGT GCC AGC AGC CAA G V $\beta$ 9.2 (IGRb20)	E A D AG GCC G	I Q Y F AC ATT CAG TAC TTC J $\beta$ 2.4

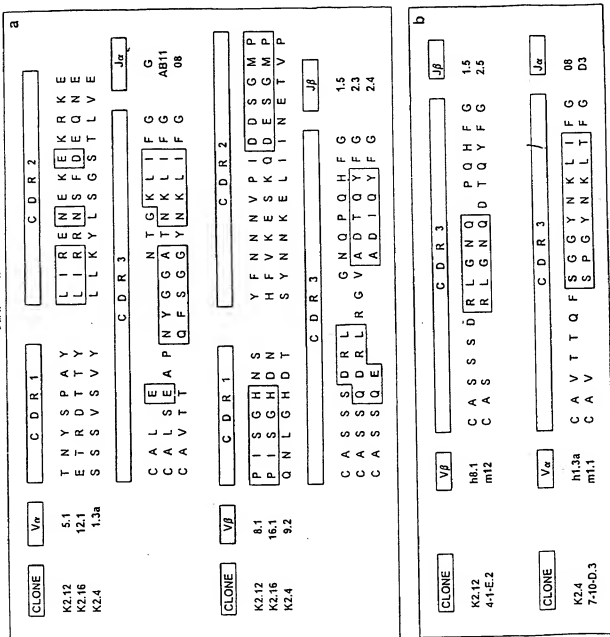
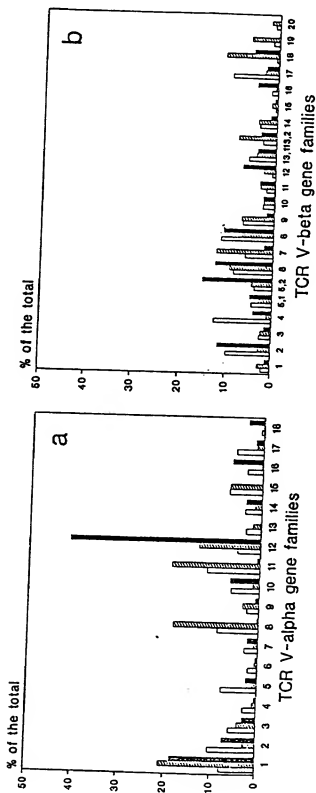
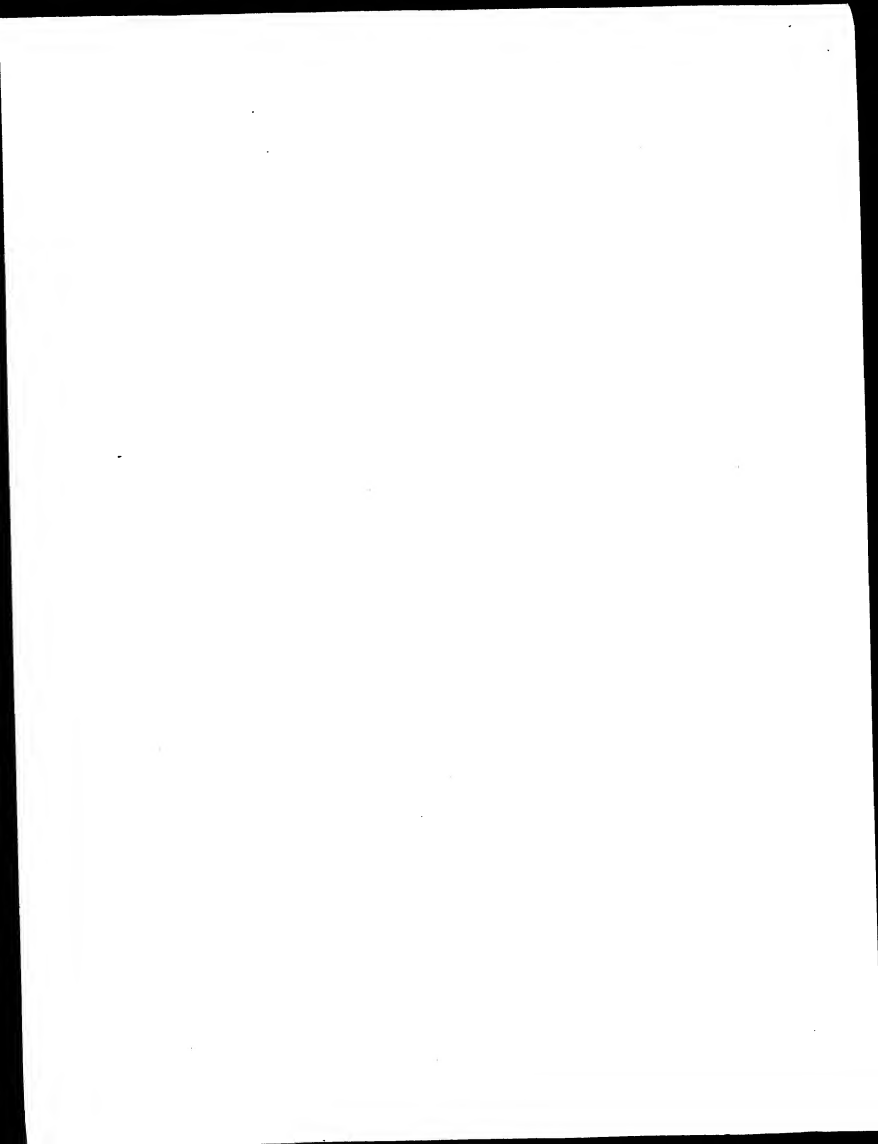


FIG. 2



Fig. 3





(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

**EP 0 676 468 A3**

(12)

**EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(88) Veröffentlichungstag A3:  
06.05.1999 Patentblatt 1999/18

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>: **C12N 15/12**, C07K 14/725,  
C07K 16/28, A61K 38/17,  
A61K 39/395, C12N 5/10

(43) Veröffentlichungstag A2:  
11.10.1995 Patentblatt 1995/41

(21) Anmeldenummer: 95103785.2

(22) Anmeldetag: 15.03.1995

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU MC NL  
PT SE  
Benannte Erstreckungsstaaten:  
LT SI

(30) Priorität: 16.03.1994 DE 4406999

(71) Anmelder: B. BRAUN MELSUNGEN AG  
34212 Melsungen (DE)

(72) Erfinder:  
• Ziegler, Annette G., Dr.  
D-80636 München (DE)

• Schendel, Dolores, Prof. Dr.  
D-41065 München (DE)  
• Steinle, Alexander  
D-80992 München (DE)  
• Durinovic-Bello, Ivana, Dr.  
D-82031 Grünwald (DE)

(74) Vertreter:  
Welss, Wolfgang, Dipl.-Chem. Dr. et al  
Patentanwälte  
Welckmann & Partner,  
Kopernikusstrasse 9  
81679 München (DE)

(54) **Humane T-Zellrezeptoren zur diagnostischen sowie therapeutischen Verwendung bei  
autoimmunem Diabetes mellitus**

(57) Die Erfindung betrifft neue Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen des humanen T-Zellrezeptors und deren Verwendung für die Diagnostik und Therapie des autoimmunen Typ I Diabetes mellitus.

**EP 0 676 468 A3**



Europäisches  
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung  
EP 95 10 3785

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
P, X	DURINOVIC-BELLÖ, I. ET AL.: "HLA-DQ-restricted, Islet-specific T-cell clones bof a type I diabetic patient" DIABETES, Bd. 43, Nr. 11, November 1994, Seiten 1318-1325, XP002095565 * Seite 1320 - Seite 1324 * * Results and Discussion * * Abbildungen 3, 4 *	1-22, 28	C12N15/12 C07K14/725 C07K16/28 A61K38/17 A61K39/395 C12N5/10
P, X	EMBL DATABASE; EMHUM2:HSTCRB1J; ACCESSION-NR.: Z28344,31. Dezember 1994, XP002095566 * das ganze Dokument *	1-3, 12-17	
X	EMBL DATABASE; EMROD:MMSSTR2; ACCESSION-NR.: X68951,8. Dezember 1992, XP002095567 * das ganze Dokument * & VANETTI, M. ET AL.: "Cloning and expression of a novel mouse somatostatin receptor (SSTR2B)" FEBS LETTERS, Bd. 311, 1992, Seiten 290-294,	1,12,22	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6)  C07K
X	EMBL DATABASE; EMROD:MMTCGXG; ACCESSION-NR.: M13337,19. September 1987, XP002095568 * das ganze Dokument * & GARMAN, R.D. ET AL.: "Diversity, rearrangement, and expression of murine T cell gamma genes" CELL, Bd. 45, 1986, Seiten 733-742,	1,12,22	
		-/-	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort <b>MÜNCHEN</b>	Abschlußdatum der Recherche <b>4. März 1999</b>	Pächter <b>Donath, C</b>	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
<p>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet  Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie  A : technologischer Hintergrund  O : nichttechnische Offenbarung  P : Zwischenliteratur</p> <p>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsatze  E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist  D : in der Anmeldung angeführtes Dokument  L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument</p> <p>&amp; : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>			

EP 0 676 468 A3 (P4C33)



Europäisches  
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung  
EP 95 10 3785

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
Y	DURINOVIC-BELLÖ, I. ET AL.: "Analyse von T-Zell-Rezeptoren (TZR) und MHC-Restriktionsmolekülen von Betazellpeptid-spezifischen T-Zell-Klonen eines Typ-1-Diabetes-Patienten" IMMUNOBIOLOGY, Bd. 189, Nr. 1-2, September 1993, Seiten 53-54, XP002095569 * das ganze Dokument *	1-28	
Y	BERSCHICK, P. ET AL.: "Molecular analysis of the T-cell receptor V85 and V88 repertoire in pancreatic lesions of autoimmune diabetic NOD mice" JOURNAL OF AUTOIMMUNITY, Bd. 6, Nr. 4, August 1993, Seiten 405-422, XP002095570 * Seite 405 - Seite 406 * 'Zusammenfassung' * Seite 406 - Seite 410 * 'Material and Methods' * Seite 416 - Seite 419 * 'Diversity of the CDR3 region' und 'Discussion'	1-28	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6)
Y	MAO, C. ET AL.: "T cell receptor alpha-chain repertoire of pathogenic autoantibody-inducing T cells in Lupus mice" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Bd. 152, Nr. 3, Februar 1994, Seiten 1462-1470, XP002095571 * Seite 1463 - Seite 1469 * 'Results' und 'Discussion'	1-28	
Y	WO 91 01133 A (VANDENBARK) 7. Februar 1991 * Seite 7, Zeile 2 - Seite 10, Zeile 15: Beispiel VIII *	1-28	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort MÜNCHEN		Abschlußdatum der Recherche 4. März 1999	Fürster Donath, C
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE		T: der Erfindung zugrundeliegende Theorien oder Grundsätze E: älteres Prioritätsdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldungsdatum veröffentlicht worden ist D: in der Anmeldung angeführtes Dokument L: aus anderen Quellen angeführtes Dokument * : Mitglied der patentrechtlichen Familie, übereinstimmendes Dokument	
X: von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y: von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A: technologischer Hintergrund O: nichttechnische Offenbarung P: Zwischenliteratur			

EPO FORM 1030 (02.92) (FR/DE)

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT  
 ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 95 10 3785

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentsdokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am  
 Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

04-03-1999

Im Recherchenbericht angeführtes Patentsdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9101133 A	07-02-1991	AT 161850 T	15-01-1998
		AU 652540 B	01-09-1994
		AU 6048590 A	22-02-1991
		CA 2064077 A	20-01-1991
		DE 69031919 D	12-02-1998
		DE 69031919 T	30-07-1998
		EP 0552142 A	28-07-1993
		ES 2112838 T	16-04-1998
		IL 95125 A	31-07-1995
		JP 5504939 T	29-07-1993
		US 5614192 A	25-03-1997
		US 5776459 A	07-07-1998
-----			

EPO FORM 1044

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82